

République du MALI
Ministère du Développement Rural et de l'Eau
LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE
Km8, Route de Koulikoro
BP 2295
BAMAKO
Mali

République Française
Ministère des Affaires Etrangères
20, rue Monsieur
75700 PARIS 07 SP
France

MISSION D'APPUI TECHNIQUE A LA PRODUCTION DE VACCINS BACTERIENS AU LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE DE BAMAKO (MALI)

**Rapport de mission
Du 21 juin au 6 juillet 1999**

Jean-Jacques TULASNE
CIRAD-EMVT
Montpellier

Rapport n° 99-038

Août 1999



CIRAD-EMVT
Département Elevage et Médecine
Vétérinaire du CIRAD
Campus International de Baillarguet
B.P. 5035
Montferrier-sur-Lez
34032 Montpellier Cedex

AUTEUR: Jean-Jacques TULASNE

ACCÈS au DOCUMENT :
Service Documentation du CIRAD

ORGANISME AUTEUR :
CIRAD-EMVT

**ACCÈS à la RÉFÉRENCE du
DOCUMENT :**
Libre

ETUDE FINANCÉE PAR :

Ministère des Affaires Etrangères PARIS France

REFERENCE :

Lettre de commande n° 99-00111 00 230 75 01 du 30-04-1999

AU PROFIT DE :

Ministère des Affaires Etrangères (PARIS-France)
Laboratoire Central Vétérinaire (BAMAKO-Mali)

**TITRE : MISSION D'APPUI TECHNIQUE A LA PRODUCTION DE VACCINS
BACTERIENS AU LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE DE BAMAKO
(MALI)**

TYPE D'APPROCHE DATE et LIEU de PUBLICATION :

Mission d'appui – août 1999 – Montpellier - France

PAYS ou RÉGIONS CONCERNÉS :

MALI

MOTS-CLEFS :

Production, contrôle de qualité, vaccins bactériens, matériel de laboratoire –
équipements industriels

RÉSUMÉ :

Au cours de cette mission, le consultant a effectué une revue complète des **procédés de production et de contrôle de qualité des différents vaccins bactériens** commercialisés par le LCV en particulier en ce qui concerne la **microthèque**, la production en continu en **biofermenteur**, la standardisation des techniques de **contrôle de qualité**, la **maintenance**.

Il a, d'autre part, proposé un **projet d'appui de la coopération française** pour 2000 et remis au Laboratoire Central Vétérinaire une **bibliographie** complète.

SYNTHESE

- Au cours de cette mission d'appui technique de 15 jours auprès du LCV de Bamako (MALI), le consultant a effectué une **revue complète des procédés de production et de contrôle de qualité des différents vaccins bactériens** commercialisés par ce laboratoire :
Vaccins contre le charbon symptomatique, le charbon bactérien, la septicémie hémorragique et la péripneumonie contagieuse bovine.
- Il s'est attaché, en particulier, à conseiller les responsables et techniciens du LCV pour ;
 - La constitution et l'entretien d'une **microthèque** en favorisant l'isolement de souches du terrain,
 - Le **contrôle de pureté et d'identité** des souches de production,
 - L'optimisation des précultures et cultures en **biofermenteur continu**,
 - Le **contrôle de qualité** complet en cours de production et sur le produit fini,
 - Le développement d'un **nouveau vaccin bivalent contre les charbons bactériens et symptomatiques**,
 - La **maintenance** des équipements de laboratoires et industriels, accompagnée d'un plan d'investissements à moyen terme,
 - Un **projet d'appui de la coopération française** pour 2000 (formation en maintenance et missions d'appui),
- Le consultant, enfin, a remis au LCV une **bibliographie complète** sur la production et le contrôle des vaccins bactériens.
- En conclusion, le LCV se situe en bonne place dans un **contexte régional concurrentiel**. Il devra renforcer les capacités d'intervention de son **service de maintenance**. Il est souhaitable enfin, qu'il connaisse rapidement une **évolution institutionnelle** afin d'assurer son autofinancement.

SOMMAIRE

I -	Rappel résumé des termes de référence de la mission.....	1
II -	Déroulement de la mission	2
III -	Personnes rencontrées.....	5
IV -	Remerciements.....	6
V -	Présentation du Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako	7
VI -	Etude détaillée des protocoles de production et contrôle des vaccins	
	Bactériens du LCV : Commentaires et propositions	9
VI-1	Vaccin bivalent contre le charbon symptomatique : CLOSTRIVAC	9
	VI-1.1 <i>Valence clostridium chauvoei</i>	9
	VI-1.2 <i>Valence clostridium septicum</i>	14
VI-2	Vaccin monovalent contre le charbon bactérien : ANTHRAVAC.....	15
VI-3	Proposition d'un vaccin mixte charbon symptomatique-Charbon bactérien.....	17
VI-4	Vaccin monovalent contre la septicémie hémorragique des bovidés : PASTOBOV.....	18
VI-5	Vaccin monovalent contre la péripneumonie contagieuse bovine PERI-T1.....	20
VII -	Contrôle de qualité des vaccins	23
VIII -	Microthèque de production.....	24
IX -	Equipements industriels et de laboratoire : maintenance et investissements	25
X -	Projet d'appui de la coopération française auprès du LCV.....	26
XI -	Bibliographie	28
XII -	Conclusion	30

ANNEXES

I	-	Valence clostridium chauvoei
2	-	Valence clostridium septicum
3	-	Valence bacillus anthracis – souche 34 F ₂
4	-	Valence pasteurilla multocida 6 : E ; 6 : B
5	-	Valence PPCB – souches T ₁
6	-	Contrôle de qualité des vaccins

I - RAPPEL RESUME DES TERMES DE REFERENCE DE LA MISSION

- Revue des **protocoles de production** en biofermenteur du **contrôle de qualité** des vaccins produits, y compris les contrôles d'efficacité.
- Isolement de **souches locales**.
- **Formation** technique des agents.

II - DEROULEMENT DE LA MISSION

(21 juin au 7 juillet 1999)

Lundi 21 juin :

- Matin :
 - Départ de Paris à 11h00 du matin Vol international Paris-Bamako
- Après-midi :
 - Arrivée à Bamako
Accueil à l'aéroport par le Dr Diallo Boubacar, chef de la division production de vaccins du LCV.
 - Transfert au Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako (LCV) et accueil par le Dr Oumar Diall, Directeur Général.

Mardi 22 juin :

- Matin :
 - Entretien au Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Bamako avec M. Laurent Bedu, Conseiller.
 - Réunion de travail pour l'organisation de la mission avec le Dr Diallo Boubacar et M. Cheick Abou Samake, Technicien Supérieur.
- Après-midi :
 - Travail de laboratoire.
 - Entretien avec le Dr O. Diall.

Mercredi 23 juin :

- Matin :
 - Travail de laboratoire.
- Après-midi :
 - Entretien avec le Dr Diall.

Jeudi 24 juin :

- Matin :
 - Travail de laboratoire.
 - Entretien avec le Dr Vincent Pfister (Parc Mali).
- Après-midi :
 - Travail de laboratoire.

Vendredi 25 juin :

➤ Matin :

- Entretien avec le Dr Sidibe Samba, Directeur de la cellule régionale OUA/IBAR-PARC.
- Réunion avec Mme Cisse Alimatou, Chef de la section de contrôle de vaccins au LCV et avec M. Oumar Kantao, Technicien Supérieur.
- Travail de laboratoire.

➤ Après-midi :

- Consultation de documents.

Samedi 26 juin et dimanche 27 juin :

- Consultation de documents,
- Rédaction du rapport,
- Repos.

Lundi 28 juin :

➤ Matin et après-midi :

- Travail de laboratoire.

Mardi 29 juin :

➤ Matin :

- Réunion avec M. Adama Fane, Ingénieur Zootechnicien adjoint du Chef de la section diagnostic bactériologique.
- Travail de laboratoire.

➤ Après-midi :

- Travail de laboratoire.

Mercredi 30 juin :

➤ Matin :

- Entretien avec M. Aguibou Tall, Assistant de production (Vaccin PPR).
- Travail de laboratoire.

➤ Après-midi :

- Travail de laboratoire.

Jeudi 1^{er} juillet :

➤ Matin :

- Entretien avec M. Hamidou Kanoute, Ingénieur Principal de maintenance.
- Travail de laboratoire.

➤ Après-midi :

- Réunion avec le Dr Niang Mamadou, Responsable de la section mycoplasmes.

Vendredi 2 juillet :

- Matin :
 - Travail de laboratoire.
- Après-midi :
 - Consultation de documents.
 - Rédaction du rapport.

Samedi 3 juillet et dimanche 4 juillet :

- Consultation de documents.
- Rédaction du rapport.
- Repos.

Lundi 5 juillet :

- Matin :
 - Réunion de restitution au LCV sous la présidence du Dr Diall, Directeur Général, en présence des responsables de la production et de la recherche.
- Après-midi :
 - Réunion avec Mme Cisse Alimatou, Chef de la section contrôle des vaccins.
 - Réunion avec le Dr Karim Tounkara, Chef de la division diagnostic et recherche.

Mardi 6 juillet :

- Matin :
 - Réunion avec M. Hamidou Kanoute, Ingénieur Principal de maintenance.
 - Consultation de documents.
- Après-midi :
 - Réunion finale avec le Dr Diall et ses collaborateurs.
 - Réunion de restitution au Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Bamako avec M. Laurent Bedu, Conseiller, en présence du Dr Diall.
 - Départ pour Paris à 23 h – vol international Bamako/Paris

Mercredi 7 juillet :

- Matin :
 - Arrivée à Paris à 7 heures du matin.
 - Arrivée à Montpellier à 11h30 du matin.

III - PERSONNES RENCONTREES

LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE DE BAMAKO (LCV)

- Dr Oumar Diall, Directeur Général
- Dr Diallo Boubacar Ousmane, Chef de la division production de vaccins
- M. Cheick Abou Samake, Technicien Supérieur
- Dr Moussa Kongossia Coulibaly, Chef de la section vaccins mycoplasmaux
- M. Aguibou Tall, Assistant de production (Vaccin PPCB)
- Mme Cisse Alimatou, Chef de la section contrôle des vaccins
- M. Oumar Kantao, Technicien Supérieur de la section contrôle des vaccins
- M. Adama Fane, Ingénieur Zootechnicien adjoint au Chef de la section diagnostic bactériologique
- Dr Niang Mamadou, Responsable de la section mycoplasmes
- Dr Karim Tounkara, Chef de la division diagnostic et recherche
- M. Hamidou Kanouté, ingénieur principal de maintenance

CELLULE REGIONALE OUA/IBAR-PARC

- Dr Sidibe Samba, Directeur

PARC MALI

- Dr Vincent Pfister (ATD Coopération française)

AMBASSADE DE FRANCE A BAMAKO : SERVICE DE COOPERATION ET D'ACTION CULTURELLE (SCAC)

- M. Laurent Bedu, Conseiller

IV - REMERCIEMENTS

Le consultant tient à remercier très sincèrement le Docteur Oumar Diall, Directeur Général du Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako et tous ses collaborateurs, en particulier le Docteur Diallo Boubacar Ousmane et M. Cheick Abou Samake pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et leur collaboration tout au long de cette mission.

V - PRESENTATION DU LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE DE BAMAKO (LCV)

- ♦ Le LCV est un établissement public à caractère administratif (**EPA**) depuis 1994. Il employait **118** agents en 1998.

- ♦ **Ses missions sont :**

- **La prévention et l'éradication** des maladies animales par le diagnostic et la recherche appliquée.
- L'amélioration de la **santé publique** : dépistage des zoonoses et hygiène alimentaire.
- La **production de vaccins**.
- La **formation** et le recyclage.
- Le contrôle et la répression de l'importation et du transit des **déchets toxiques**.

- ♦ Sa **gamme de production** est **diversifiée** et correspond à la demande régionale

- BOVIPESTE	Vaccin contre la peste bovine (50 doses)
- OVIPESTE	Vaccin contre la peste des petits ruminants (50 doses)
- PERI-TI	Vaccin contre la péripneumonie contagieuse bovine (50 doses)
- BISSEC	Vaccin contre la peste et la péripneumonie contagieuse bovine (50 doses)
- DERMAPOX	Vaccin contre la Dermatose nodulaire contagieuse bovine, la clavelée et la variole caprine (50 doses)
- ANTHRAVAC	Vaccin contre le charbon bactérien (50 doses)
- PASTOBOV	Vaccin contre la septicémie hémorragique des bovidés (50, 125 et 150 doses)
- PASTOVIN	Vaccin contre la pasteurellose des petits ruminants (25 et 50 doses)
- SYMPTOVAC	Vaccin monovalent contre le charbon symptomatique (50, 125 et 150 doses)
- CLOSTRIVAC	Vaccin bivalent contre le charbon symptomatique (50, 125 et 150 doses)

- ♦ 2 vaccins en projet :
 - **Maladie de Newcastle** : collaboration avec MERIAL, fourniture de principe actif.
 - **Botulisme** : contacts avec l'OVI d'Onderstepoort (Afrique du Sud).

- ♦ **Production de vaccins en 1998 :**

- **Objectifs 1998 : 10 millions de doses** (tous vaccins confondus)
- **Réalisé en 1998 : 10 668 050 doses (+ 6.7 %)**

PERI-TI	4 665 800 doses
PASTOBOV	3 250 275 doses
CLOSTRIVAC	1 866 350 doses
ANTHRAVAC	178 850 doses
PASTOVIN	706 775 doses
TOTAL	10 668 050 doses

- **Contrôles :**
 - ❖ **PANVAC :** vaccins vivants lyophilisés 9 lots PERI-T1 (2 T₁ 44, 7 T₁ SR)
 - ❖ **Internes :** vaccins inactivés liquides
 - ❖ **Taux de rejet total : 1,15 %** (1 lot de CLOSTRIVAC)
- ♦ **Ventes de vaccins réalisées en 1998 :**
- **Objectifs 1998 : 12 274 700 doses** (+ 10 % par rapport à 1997)
- **Réalisé en 1998 : 11 541 750 doses** soit **94 % des objectifs** et **3.43 %** de plus qu'en 1997
- **Ventes à l'exportation en 1998 : 31.5 %** du chiffre d'affaire (17 % en 1997)
- **Chiffre d'affaire 1998 :**
 - ❖ **290 232 200 FCFA**
 - ❖ **259 527 259 FCFA en 1997** soit une progression de **11.8 %** en 1 an
- **Bénéfices :**
 - ❖ **30 millions** de FCFA en **1997**
 - ❖ **70 millions** de FCFA en **1998**
- ♦ **Le LCV fonctionne à 59 % sur fonds propres** avec une participation de :
 - **l'Etat (33.7 %)**
 - **partenaires étrangers (7.3 %)**
- ♦ **Des équipements industriels ont été acquis en 1997 :**
 - **Financement APEX (USAID)**
 - ❖ **Coût total : 225 000 000 FCFA** (investissements + aménagements)
 - ❖ 1 chaîne de répartition automatique
 - ❖ 1 étiquetteuse
 - ❖ 2 cuves d'homogénéisation des vaccins bactériens et viraux
 - ❖ 1 four électrique
 - ❖ 1 congélateur à -180°C
 - ❖ 1 équipement complet pour une salle stérile
 - **Financement sur fonds propres**
 - ❖ **Coût total : 80 000 000 FCFA** pour une unité de biofermentation en continu.

VI - ETUDE DETAILLEE DES PROTOCOLES DE PRODUCTION ET CONTROLE DES VACCINS BACTERIENS DU LCV : COMMENTAIRES ET PROPOSITIONS

VI-I. VACCIN BIVALENT CONTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE : CLOSTRIVAC

Ce vaccin est composé d'anacultures de *clostridium chauvoei* et *clostridium septicum* adjuvées avec de l'hydroxyde d'alumine.

VI-I.1 – VALENCE CLOSTRIDIUM CHAUVOEI :

▪ Souche de production :

- la souche utilisée actuellement depuis 1998 est la souche « **SIDAMO** » (1990-EMVT). **Pas de lot lyophilisé.**
- Antérieurement le laboratoire utilisait la souche « **MADAGASCAR** » (1986-Dakar-EMVT). **Elle est lyophilisée (1 lot).**
- Le LCV préfère s'orienter vers **l'isolement de souches locales.**
- Propositions :
 - Il faut d'urgence **sécuriser la souche « SIDAMO » par lyophilisation** et refaire 1 lot lyophilisé de la souche « **MADAGASCAR** ».
 - Isoler, identifier et lyophiliser des souches locales à partir des prélèvements suivants : muscle, foie, os long entier, sang du cœur (disques buvards). Ensemencer des bouillons VF, VL, géloses profondes et au sang en jarre anaérobie avec gaspack. Envoyer les souches de 1^{er} isolement en gélose profonde à **l'Institut Pasteur de Paris** (service des anaérobies) par l'intermédiaire du Cirad-emvt pour identification complète
- **Rappel de la technique de préparation d'une souche clostridium chauvoei pour la lyophilisation :**

A partir d'une culture sur gélose au sang, ensemencer un bouillon viande-foie (BVF) ou un bouillon viande-levure (BVL) ou un bouillon RCM. **Inoculer la culture à un cobaye** par la voie intramusculaire profonde (avec addition de chlorure de calcium à 5% à la culture).

Ensemencer un bouillon VF ou VL ou RCM à partir du sang du cœur et de la lésion musculaire au point d'inoculation.

Lyophiliser la sub-culture additionnée de lait UHT ou de sérum de cheval (**voir techniques détaillées en Annexe 1**).

- Rappel des tests d'identification de clostridium chauvoei et diagnostic différentiel avec clostridium septicum

	CLOSTRIDIUM SEPTICUM	CLOSTRIDIUM CHAUVOEI
GRAM	+ FAIBLE	+ FAIBLE
MOBILITE	+ EN CULTURE JEUNE	+ EN CULTURE JEUNE
SPORES	+ OVOIDES DEFORMANTES CENTRALES OU SUBTERMINALES	+ IDEM
GELOSE PROFONDE	COLONIES OUATEES, FLOCONNEUSES ARBORESCENTES + GAZ	COLONIES PUNCTIFORMES OU LENTICULAIRES, PLATES, TRANSPARENTES + GAZ
GELOSE BOITE DE PETRI ANAEROBIE	RHIZOIDES OU ENVAHISSANTES	COLONIES ARRONDIES A BORD REGULIER PLISSEES OU OMBONNEES
HEMOLYSE (HEMATIES MOUTON)	+	++
GELOSE BOITE DE PETRI : CONTROLE AEROBIOSE	-	-
SALICINE	+	-
SACCHAROSE	-	+
DERMONECROSE PEAU COBAYE	+	-

Les **galeries API.20A** sont utilisables pour l'identification des clostridies mais attention à la **date de péremption**.

- **NB :** Le consultant a sensibilisé les techniciens du LCV à l'importance de la **morphologie des colonies pour le diagnostic différentiel CL. Chauvoei, CL. Septicum**. Avec l'accord de la Direction du LCV, le consultant a transmis à son retour, une gélose profonde de cette souche à **l'Institut Pasteur de Paris (Service des anaérobies) pour contrôle d'identité** (résultat en attente).

▪ **Culture en biofermenteur en continu :**

Le consultant propose un certain nombre **d'essais pour optimiser cette production**.

- **Préculture :**

Essayer de partir d'une pastille lyophilisée et **ensemencer un erlenmeyer** de BLV, BVF ou RMC pour obtenir de **5 à 10 % d'inoculum V/V** pour le biofermenteur. La culture devrait démarrer plus rapidement par rapport au procédé utilisé actuellement (**préculture à partir d'une colonie**).

- **PH du milieu avant ensemencement :**

7,4 - 7,6 (plutôt que 6,8 – 7 actuellement) avec rectification du PH à 7,2.

- **Addition d'azote :**

Actuellement de l'azote est injecté en surface pendant tout le temps de culture. Pour réduire le coût de cette opération, il est proposé d'injecter de **l'azote en début de culture et d'arrêter dès le démarrage de la culture** (diminution du PH par rapport au PH de départ).

- **Vitesse d'agitation :**

Essayer **100 T/Min** au lieu de 300 T/Min actuellement pour maintenir le **redox** à bas niveau.

- **Optimisation de la culture en continu :**

- Effectuer des **prélèvements successifs** en cours de culture en biofermenteur afin d'établir **la courbe de croissance**.
- Evaluer la croissance par opacimétrie (échelle de Mac Farland), détermination du poids sec, dénombrement).
- Déterminer **le moment optimum** de début de transfert de milieu neuf et de récolte simultanée de la première culture (**système Chemostat** avec pompes peristaltiques) en fonction de **la pente de la courbe de croissance en phase exponentielle**. Corréler cette pente avec la fréquence **de rectification du PH à 7,2**. Empiriquement on se trouve au milieu de la phase exponentielle lorsque la rectification du PH à 7,2 est fréquente et importante (système de régulation du PH proportionnel intégral différentiel – **PID**). Ultérieurement, en production de routine, l'observation directe de l'évolution du PH devrait permettre de décider du moment de démarrage du système Chemostat.

- **Contrôle en cours de production à tous les stades du procédé :**
 - **Etat frais**
Le LCV devrait acquérir un système de **contraste de phase**.
 - **Gram**
 - **Hémolyse :**
Mettre au point une technique simple avec hématies de moutons en microplaques avec des dilutions successives de toxine.
 - **Contrôle bactériologique complet** en fin de culture.

- **Arrêt de la culture : formolisation**
 - La culture (10 litres de concentrat) est formolée à **3 ‰** et stockée **48 h seulement à 37°C** afin de garantir l'intégrité de l'anatoxine.
 - Puis l'anaculture est séparée de l'anatoxine par filtration.
 - **L'anaculture seule est reformolée à 5 ‰** dans un volume égal d'eau physiologique. Il faudrait **préciser le taux de formol nécessaire et suffisant pour obtenir, in fine, au maximum 0,5 ‰ de formol libre (norme européenne)** et voir s'il ne serait pas nécessaire de replacer l'anaculture seule à l'étuve pour parfaire la formolisation. Il est proposé d'étudier les paramètres taux de formol et temps d'étuve complémentaires en plaçant des anacultures reformolées à 1, 2, 3, 4, 5 ‰ pendant 2, 4, 6, 8, 10 jours à 37°C. **Sélectionner le taux de formol complémentaire et le temps d'étuve qui permet d'obtenir un taux de formol libre inférieur ou égal à 0,5 ‰.** L'important est de **sécuriser l'inactivation**. Le **risque de revivification des bactéries** doit être pris en compte.
Le processus de formolisation s'opère en 2 phases :
 - **Fixation réversible** du formol sur les bactéries.
 - Suivi d'une **fixation irréversible** une partie étant **liée** et l'excédent constituant **le formol libre**. Pour le titrage du formol du commerce et du formol libre se référer au chapitre Contrôle de qualité (cf. paragraphe VII).
Par expérience, le consultant précise, qu'en général, pour la valence clostridium chauvoei :
 - l'inactivation par le formol est totale et irréversible après **1 semaine à 37°C**,
 - le taux de formol libre est stable après **10 jours d'inactivation à 37°C**.

- **Dilution du concentrat inactivé pour la préparation du vaccin final :**
Pour déterminer le facteur de dilution maximum du concentrat, il est proposé de **comparer, pour une culture en continu et une culture en discontinu** (Batch), l'opacimétrie ou le dénombrement ou les poids secs et d'en déduire le taux de dilution possible. On trouve dans la littérature les données suivantes :
Poids sec : 1,5 mg poids sec/dose 2 ml ou $5 \cdot 10^9$ bactéries/dose 2 ml.

- **Adjuvants :**
 - Par expérience, **l'hydroxyde d'alumine est préférable à l'alun de potassium :**
 - Remise en suspension plus facile,
 - Meilleure innocuité.

- Au LCV on utilise hydroxyde d'alumine à 2 ‰ il serait préférable de passer si possible (problème de coût) à 10 ‰. L'adsorption sera meilleure et la réponse immunitaire favorisée.
 - Pas de norme européenne pour l'hydroxyde d'alumine dans les vaccins vétérinaires.
 - Pour le titrage de l'ion aluminium, de l'alum, et de l'hydroxyde d'alumine se référer au chapitre Contrôle de qualité (cf. paragraphe VII).
- **Documents en Annexe 1**
- **Séminaire FAO sur la production de vaccins bactériens (Garoua, Cameroun, mai 1989).**
Production et contrôle de qualité du vaccin contre le charbon symptomatique par J.J. Tulasne.
 - Production de vaccins contre la fièvre charbonneuse et le charbon symptomatique
Etude FAO production et santé animales n°87-1992.
 - Vaccin de clostridium chauvoei pour usage vétérinaire. **Pharmacopée européenne 1997.**
 - Production outline for clostridium chauvoei challenge culture **USDA – 1972.**
- **Contrôle de qualité de la valence clostridium chauvoei**
- **Contrôle de stérilité – innocuité**
Cf. **pharmacopée européenne** en **Annexe 1**. Pour l'innocuité préférer les **chèvres** plus sensibles.
 - **Contrôle d'activité :**
 - **Cobayes :** préférer l'épreuve avec une **suspension de spores** additionnée de chlorure de calcium à 5 % (technique de préparation des spores **en Annexe 1**, document FAO n°87-1992 p. 89-90 et technique USDA-1972) ou une hémoculture de sang du cœur de cobaye.
 - **Bovins :** classiquement il y a un parallélisme entre la protection chez le cobaye et chez les ruminants.
- **Etiquettes**
- Ajouter : - **Usage vétérinaire (en rouge)**
- **Conservation +2°C, +8°C (5°C ± 3)**

▪ **Notice technique :**

Il faudrait préciser :

- **Définition du vaccin :**

Anatoxines et anacultures de *Clostridium chauvoei* et *Clostridium septicum* obtenues par un procédé de biofermentation en continu, inactivées par le formol et additionnées d'hydroxyde d'alumine comme adjuvant de l'immunité.

- **Mode d'emploi :**

• **Primovaccination :** 2 injections à 3 ou 4 semaines d'intervalle sont nécessaires pour assurer une bonne immunité de base.

• **Rappel annuel.**

Commentaire : chez le cobaye une seule vaccination chez un animal naïf ne protège qu'à 60 % après épreuve virulente.

- **Conservation :** + 2°C, + 8°C.

- **Ne pas congeler**

Commentaire : la congélation annihile le processus d'adsorption sur hydroxyde d'alumine.

VI-1.2. VALENCE CLOSTRIDIUM SEPTICUM :

- On observe au Mali, depuis plusieurs années, des échecs de vaccination avec le vaccin monovalent *Clostridium chauvoei*.
- Une souche de terrain *Clostridium septicum* a été identifiée en 1994 par le LCV sans confirmation par un laboratoire extérieur. Elle est utilisée actuellement en production.
- Avec l'accord de la direction du LCV le consultant a transmis, à son retour, une gélose profonde des 2 souches de production *Clostridium chauvoei* et *septicum* à l'Institut Pasteur de Paris (service des anaérobies) pour contrôle d'identité (résultat en attente).
- Choix d'une souche de production *Clostridium septicum* :
 - soit la souche LCV 94 après confirmation par l'Institut Pasteur de Paris,
 - soit une souche de collection (collection de l'Institut Pasteur, par exemple) à acquérir,
 - soit une nouvelle souche de terrain (à faire confirmer par l'Institut Pasteur).
 - Le Cirad-emvt peut se charger de transmettre les souches en provenance du Mali à l'Institut Pasteur de Paris :
Les envoyer par DHL,
Prévenir 15 jours ou 3 semaines à l'avance l'emvt pour demander une **autorisation d'importation** au Ministère français de l'Agriculture (DGAL).

- **Procédé de production et contrôle** : voir valence chauvoei, chapitre VII-1.1.
- **Titration de la toxine** :
 - Inoculation par la voie intraveineuse (veine caudale) chez la souris : une toxine satisfaisante titre **300.500 DMM/ml** (DMM = dose minima mortelle).
 - Titre hémolytique en microplaque.
- **Titration d'activité de l'anatoxine** :
 - Pour la valence clostridium septicum **la protection est assurée essentiellement par l'anatoxine** : on peut donc, ainsi, éliminer les corps bactériens par filtration.
 - Le principe du titrage de l'anatoxine est le suivant :
 - **Vaccination de lapins** avec une anatoxine clostridium septicum adjuvée.
 - **Séroneutralisation des anticorps** induits chez le lapin mis en présence à des doses décroissantes d'une quantité fixe de toxine étalon de laboratoire, elle-même titrée par rapport à un sérum étalon international.
 - Injection des mélanges en proportions variables en intraveineux à des souris.
 - L'activité des sérums de lapins n'est pas inférieure à **2,5 UI d'antitoxine par millilitre** (cf. pharmacopée européenne 1997 **en annexe 2**).
- **Proposition** :
Le plus simple, dans un premier temps, serait de **sélectionner une souche toxigène** (300-500 DMM/ml par intraveineuse chez la souris).

VI-2. VACCIN MONOVALENT CONTRE LE CHARBON BACTERIDIEN : ANTHRAVAC

- **Souche de production** :
 - **Souche B. Anthracis 34 F₂ Sterne** (lyophilisée en 1990).
 - **Contrôle d'identité de la souche au LCV** :
Mobilité –
Gram +
Capsule – (**voir technique à l'encre de chine**)
Colonies : « R »
Hémolyse –
Gélatinolyse + lentement
Pouvoir pathogène – cobaye. **A contrôler chez le lapin**
Test d'Ascoli
Ce contrôle est satisfaisant. Il est effectué 1 fois par an.
 - NB : Diagnostic différentiel B. Anthracis
B. Cereus

	B. ANTHRACIS 34 F2	B. CEREUS
MOBILITE	-	+ (lentement)
CROISSANCE 45°C	LEGERE	RAPIDE
LECITHINASE	-	+++
HEMOLYSE	-	+++ (très rapide)
SALICINE	-	+
GELATINOLYSE	+ (lentement)	+++ (rapide)
SENSIBILITE A LA PENICILLINE	+	-

▪ **Technique de production au LCV :**

- **Culture en fermenteur en discontinu** (lot expérimental)
- Milieu de Sterne (500 ml)
- Agitation au début
- Temps de culture : **48 h**
- **Dénombrement des spores/ml culture brute (fermenteur)**
1,7.10⁹ spores/ml
Ce résultat est très correct si l'on compare aux résultats obtenus en boîtes de Roux par d'autres producteurs connus du consultant.
- **1 seul lot expérimental** a été produit dans ces conditions en Allemagne (1998) au cours d'un stage dans ce pays d'un technicien du LCV.
- La production en fermenteur présente l'avantage de simplifier considérablement les manipulations par rapport aux boîtes de Roux.
- **Commentaires :**
 - Le vaccin est liquide et non glyciné. Il faudrait vérifier, dans ces conditions, par dénombrement dans le temps, que le temps de conservation **de 2 ans à + 4°C** proposé dans la notice technique est acceptable.
 - **Le contrôle d'activité** sur cobaye n'a été réalisé qu'une seule fois. Il faudrait le répéter **une fois par an**.
 - **Dose vaccinale : Rappel** (OIE Manual 1996)
 - Bovins, équins : 2-10x10⁶ spores vivantes
 - Ovins, caprins, porcins : 1-5x10⁶ spores vivantes

▪ **Documents en annexe 3**

- **Séminaire FAO sur la production des vaccins bactériens (Garoua, Cameroun, mai 1989)**
Production et contrôle de qualité du vaccin contre le charbon bactérien (J.J. Tulasne).
- Production de vaccins contre la fièvre charbonneuse et le charbon symptomatique
Etude FAO production et santé animales n° : 87-1992.
- Vaccin vivant sporulé de la fièvre charbonneuse pour usage vétérinaire
Pharmacopée européenne 1997

VI-3. PROPOSITION D'UN VACCIN MIXTE : CHARBON SYMPTOMATIQUE – CHARBON BACTERIDIEN

- Au cours de sa mission, le consultant a proposé à ses collègues du LCV **d'étudier la faisabilité** de la mise au point d'un vaccin mixte contre les deux charbons.
- Un tel vaccin **devrait correspondre à une demande du terrain**, bien qu'actuellement, le clostrivac se vende pratiquement **10 fois plus** que l'anthravac.
- Une telle proposition vient du fait qu'au LCV **le principe actif final clostridium chauvoei inactivé se présente sous forme de concentrat** (bactéries + anatoxine), qu'il est possible de **rediluer** tel quel, sans opération complémentaire, **dans une autre valence telle que bacillus anthracis 34 F₂ Sterne**, à la place du sérum physiologique habituel.
- Le consultant a mis en place avec succès cette production au **laboratoire Biopharma de Rabat en 1987-1988** (2 missions). Ce vaccin est, à ce jour, toujours commercialisé par ce laboratoire.
- **Le problème posé est le suivant :**
Comment **mélanger une valence inactivée par le formol** (clostridium chauvoei) avec **une valence constituée de spores vivantes** (bacillus anthracis) sensibles au formol ?
- La technique mise au point au Maroc permet de résoudre ce problème : on peut **neutraliser le formol libre de la valence clostridium chauvoei à la fin de sa phase d'inactivation**.
- **La technique de neutralisation du formol libre est la suivante :**
 - On neutralise le formol libre avec le **metabisulfite de sodium** (sodium disulfite = $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) **PM = 190,1**, le **PM du formol étant de 30,02**.
On utilise 2 moles de metabisulfite par mole de formol libre.
 - **En pratique, on utilise la formule suivante :**
 - Soit **A** = nombre de μg de formaldéhyde libre par ml de vaccin (cf. technique de titrage paragraphe VII).
Soit **B** = nombre de ml d'une solution molaire de metabisulfite de sodium à ajouter à un litre de vaccin pour neutraliser le formaldéhyde libre.
 - On calcule : **$B = A \times 0,06662$** .
 - Après agitation de quelques minutes on corrige le PH par adjonction de soude N/10 jusqu'à la neutralité.
 - On vérifie par dénombrement des spores que le formol est bien neutralisé.
 - **Cette neutralisation est irréversible et stable dans le temps.**
 - Au Maroc, le vaccin final est constitué des deux valences contenant les quantités standards habituelles de spores (B. anthracis) et de bactéries + anatoxine (Cl. Chauvoei) rediluée dans du **sérum physiologique glyciné**, (à parties égales).
Pas de saponine, pas d'hydroxyde d'alumine.

VI-4. VACCIN MONOVALENT CONTRE LA SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE DES BOVIDES : PASTOBOV

▪ Souche vaccinale :

- Le LCV utilise actuellement la souche **pasteurella multocida 6 : E** (lyophilisée en 1986).
- Des colonies de cette souche isolées sur gélose-sérum inclinée ont été observées par le consultant à partir d'une pastille lyophilisée.
Elles sont bien de type fluorescent (F). Cela ne prouve pas que le lot est **homogène**. Il faudrait vérifier, cependant, qu'il n'y a pas de **dissociation** des colonies d'une pastille lyophilisée à une autre (**contrôler la phase fluorescente** pour chaque pastille utilisée en production).
- **Rappel : il est impératif de contrôler à chaque production la phase des colonies.** La nomenclature habituelle des colonies de pasteurella multocida par **ordre décroissant** est la suivante :
 - **Colonies muqueuses « M »** : uniquement au 1^{er} isolement chez l'animal malade.
 - **Colonies fluorescentes « F »** : celles recherchées pour la production de vaccins.
 - **Colonies intermédiaires « I »** : intermédiaires entre « F » et la suivante « B ».
 - **Colonies bleues « B »** : plus petites que les « F » et de couleur bleue.
 - **Colonies « S »** : « Smooth » classiques.
 - **Colonies « R »** : « Rough » classiques.
- Si nécessaire, on peut **passer les souches chez l'animal** (souris, lapins, bovins) pour récupérer la phase « M » puis « F » au 1^{er} repiquage.
- Le consultant a transmis au LCV **2 nouvelles souches pasteurella multocida des sérotypes 6 : E, et 6 : B.**
 - **Pourquoi 6 : B ?**
Parce que ce serotype a été **identifié deux fois au Cameroun** ces dernières années (serotype confirmé au Cirad-emvt).
La frontière traditionnellement décrite entre les 2 serotypes avec 6 : B en Afrique de l'Est et Asie et 6 : E en Afrique centrale et de l'Ouest est « **perméable** » à cause des voies commerciales et surtout de transhumance entre les deux blocs.
 - **Le LCV devra être vigilant et faire serotyper toutes les souches de terrain isolées.** Si nécessaire, la valence 6 : B pourra donc être incorporée au vaccin actuel 6 : E monovalent.

- Il est conseillé au LCV de préparer un lot lyophilisé avec la **nouvelle souche pasteurella multocida 6 : E (Emvt)** en 3 temps :
 - **Lot de production G1** (culture jeune 18-24 h)
 - **Passage sur souris**
 - **Lot de semence G2**
- **Fermentation en continu :**
 - **Préculture : un protocole est proposé :**
 - 2 pastilles G2 ensemencées le soir dans deux tubes T.S.-Sérum (18 h de culture) et ensemencement du fermenteur le lendemain matin.
 - **Pas de passage intermédiaire sur souris** puisqu'il a été effectué entre G1 et G2 (souches sécurisées par lyophilisation).
 - En général, une culture démarre d'autant mieux que la préculture est jeune et riche (**imoculum de 5 à 10 %** par rapport au volume du milieu de culture).
 - **Culture en fermenteur :**
Le procédé est **satisfaisant**.
 - **Commentaires :**
 - Démarrer la culture plutôt à **PH 7,8 et rectifier à 7,2**.
 - Comme pour le Cl. Chauvoei **optimiser la culture en biofermenteur** continu en déterminant le moment de mise en route des **pompes péristaltiques** en phase exponentielle.
 - Il serait souhaitable de pouvoir **enregistrer la courbe de croissance en continu** pour remplacer les techniques « fastidieuses » utilisées classiquement (opacimétrie, dénombrement). Il est conseillé, à cet effet, **de contacter directement la société « Goettingen-IBT-Bioreactor »** qui a fourni le biofermenteur en continu.
 - Pour l'opacimétrie : utiliser l'échelle de Mac Farland (cf. **Annexe 4**) pour rediluer le concentrat.
- **Formolisation et adjuvant :**
Mêmes observations et propositions que pour la valence Cl. Chauvoei (voir paragraphe VI-1.1).
- **Rendement obtenu :**
1,9 10⁶ doses/lot de fermentation. Ce résultat est tout à fait **satisfaisant**.
- **Notice technique :**
Comme pour le clostrivac le **mode d'emploi recommandé** est le suivant :
 - **Primovaccination :** 2 injections à 3-4 semaines d'intervalle sont nécessaires pour assurer une bonne immunité de base.
 - **Rappel annuel**
- **Etude du pouvoir immunogène du vaccin Pastobov :**

- Une étude sur ce sujet a été effectuée au LCV en 1998 par **M. Amadou Sery** et a fait l'objet **d'un mémoire de fin d'études** (Institut Polytechnique Rural de Katiboubou).

M. Sery a travaillé sur :

- La séroneutralisation par des sérums de bovins vaccinés chez des souris soumises à une épreuve.
 - L'immunodiffusion vaccin-sérum.
 - L'hémagglutination passive sur des sérums de bovins vaccinés.
- Il a observé une **protection 150 jours après la vaccination chez les bovins.**

- Le LCV souhaite approfondir cette étude :

- **En vaccinant et éprouvant des bovins avec une souche virulente.**
- C'est une expérimentation lourde et difficile à réaliser.
- Le problème principal est **la standardisation de la souche d'épreuve** :
Le plus simple serait d'utiliser comme **dose d'épreuve standard** une quantité donnée et aliquotée (à déterminer) de sang du cœur (d'un bovin ou d'un lapin infecté) ou une hémoculture, congelée et lyophilisée. Ces doses standards seraient injectées directement, après remise en suspension, aux bovins témoins ou vaccinés à soumettre à une épreuve.
- On pourrait envisager une épreuve 3-6 mois et un an après une primovaccination (2 injections à 3-4 semaines d'intervalle).

▪ Document en annexe 4

- **Séminaire FAO sur la production de vaccins bactériens (Garoua – Cameroun – Mai 1989)**
Production et contrôle de la qualité du vaccin contre la pasteurellose bovine (septicémie hémorragique) par J.J. Tulasne.

VI-5. VACCIN MONOVALENT CONTRE LA PERIPNEUMONIE CONTAGIEUSE BOVINE PERI-T1

▪ Ce vaccin constitue la production la plus importante pour le LCV :

- La demande estimée est la suivante :
 - **Mali, Côte d'Ivoire** : 2 à 2,5 millions doses/an T₁SR
 - **Burkina Faso** : 1,2 millions doses/an T₁44
 - **Mauritanie** : 0,8 à 1 million doses/an T₁44
 - **Guinée Conakry** : 1,2 à 1,3 millions doses/an T₁44
- **Commentaires** :
 - Pas de problèmes d'innocuité avec la souche T₁44
 - Quelques réclamations sur l'immunité avec T₁SR (animaux préinfectés ?).

▪ **Souches vaccinales :**

Elles ont été fournies par le Panvac :

- T₁₄₄ : lot officiel. Ayant subi 2 passages avant lyophilisation au LCV (300 flacons)
- T_{1SR} : même protocole. Lot lyophilisé également (300 flacons)

▪ **Technique de production du vaccin :**

- **Milieu de culture :**

Milieu de Gourlay filtré **PH 7,9** au départ réparti dans des ballons de 20 litres remplis à **14 litres**.

- **Procédé de production d'un lot :**

- **Préculture :** la méthode utilisée conseillée par le Panvac permet d'optimiser les précultures en récoltant le maximum de germes en phase de croissance.
- **Cultures :**
 - Classique : **en ballons**
 - La courbe de croissance a été étudiée par des stagiaires.
 - Une **corrélation a été établie entre le temps de culture et la vitesse d'agitation. L'optimum est : 36-38 h à 80 tours/Min.**
 - **Arrêt de la culture à PH 6,8.**
- **Répartition : lyophilisation :**
Ces opérations successives sont effectuées sans attendre, **dès la fin du temps de culture**, après addition de lait écrémé.

- **L'ensemble du procédé de production est considéré comme tout à fait satisfaisant.**

▪ **Contrôle de qualité du vaccin :**

- **Les contrôles effectués sont :**

- Contrôle de pureté à tous les stades.
- Vide dans les flacons : $\leq 2\%$.
- Dénombrement.
- Contrôle d'innocuité sur animaux de laboratoires et destinataires.

- **Certains contrôles devraient être mis en œuvre :**

- Contrôle bactériologique :
 - **Etat frais par contraste de phase. Le LCV devrait acquérir cet équipement.**
 - **Coloration de Giemsa.**
 - **Observation des colonies sur milieu solide.**
 - **Humidité résiduelle : $\leq 5\%$ Méthode Karl Fischer (cf. Annexe 5).**

▪ **Résultats des contrôles officiels effectués par le laboratoire Panvac (FAO) de Debré Zeit (Ethiopie) :**

- Le consultant a consulté les résultats officiels transmis par le Panvac :

Lot n°	Nombre de germes vivants par dose
206	$7,8.10^7$
207	$7,7.10^7$
208	$7,83.10^7$
209*	$1,3.10^8$
210*	$7,9.10^7$
211*	$7,9.10^7$
212	$9,5.10^7$
217	$7,87.10^7$
218	$7,91.10^7$
219	$7,91.10^7$
Moyenne des 10 lots	$8,26.10^7$

* : Souche T₁ SR
Flacons de 50 doses

Ces résultats sont largement au dessus du standard international OIE : $1,10^7$ germes vivants/dose.

- Le LCV regrette que le Panvac ne donne pas de résultats de test d'innocuité.
- **Notice technique :**
Indiquer :
 - **Suites vaccinales éventuelles (T¹⁴⁴).**
 - **L'immunité dure au maximum 1 an.**
 - **Vaccination annuelle nécessaire.**
 - Il a été démontré que le vaccin **n'est plus conforme** à la norme internationale dès qu'il est **exposé à la température extérieure** (cf. expérimentation réalisée par le LCV ci-dessous).
- **Etude sur la conservation dans le temps du vaccin Peri-T1 stocké à différentes températures**
 - Cette étude, très intéressante et complète, conduite par le LCV, a permis d'étudier l'évolution dans le temps du dénombrement des mycoplasmes par dose de vaccins conservés à différentes températures : **+37°C, +4°C, 0°C, -20°C.**
 - Ces résultats (cf. Annexe 5) sont très significatifs et démontrent que le **respect de la chaîne du froid est impératif.**
 - Le consultant incite le LCV à **publier ses résultats** (revue Cirad-emvt par exemple).
- **Documents en Annexe 5**

- **Séminaire FAO sur la péripneumonie contagieuse des bovidés – Dakar – Novembre 1989**
Production et contrôle de qualité du vaccin monovalent contre la PPCB par J.J. Tulasne.
- Contrôle des vaccins péripneumonie – **Document Cirad-emvt** – A . Bréard et al. 1995
- Etude sur la conservation de vaccins T1 exposés à différentes températures – **Document LCV – 1999.**
- **Rappel : Document FAO n°128**
Constitue une excellente base technique pour **le contrôle de qualité des vaccins PPCB** (cf. page de couverture de ce document en **Annexe 5**).
Le LCV possède ce document.

VII – CONTROLE DE QUALITE DES VACCINS

- **Le service de contrôle du LCV fait partie de la division de la production :**
 - **Il devrait être rattaché directement à la direction générale de l'établissement.**
 - On ne peut « être à la fois juge et partie ».
- **Tous les vaccins vivants sont contrôlés par le Panvac (PB, PPR, T¹SR, T¹44) malgré les difficultés logistiques pour l'envoi des échantillons du Mali en Ethiopie (pas d'accord actuellement entre DHL et Ethiopian Airlines !).**
- **Tous les vaccins inactivés sont contrôlés en interne.**
- **Le consultant a repris vaccin par vaccin la liste et les modalités des contrôles effectués au LCV :**
 - En ce qui concerne les contrôles de **pureté, stérilité, innocuité, dénombrement, la situation est satisfaisante.**
 - **Les contrôles d'activité effectués sont insuffisants** (voir Chapitre XI).
 - **En ce qui concerne les contrôles physico-chimiques :**
 - **Le formol du commerce est titré.**
 - **Le formol libre** également mais avec une **technique non appropriée** (aquamerck-8028-formaldehyde test) sous forme de bandelettes, qui ne permet que de détecter des traces).
 - **Pas de titrage de l'ion aluminium.**
 - **Pas de titrage de l'humidité résiduelle.**

- **La détection du vide** dans les flacons de vaccins lyophilisés est effectuée.
 - Des fiches de production et de contrôle de qualité suivent les produits. Elles sont correctement rédigées (cf. Annexe 6).
- **Documents en Annexe 6**
- Afin de permettre au LCV de mettre en place les dosages du **formol libre, de l'ion aluminium, et de l'humidité résiduelle** en particulier, un certain nombre de documents figurent en **Annexe 6** :
- **Pharmacopée européenne 3^e édition**
 - **Techniques extraites des séminaires FAO** (Garoua et Dakar 1989) et **OIE** (Niamey 1997).
 - Le consultant rappelle l'existence de **documents utiles pour le contrôle de qualité et en possession du LCV**. Il s'agit du **Manual of standards OIE** (1996) et du **rapport du séminaire OIE de Niamey** (1997) (cf. photocopies des pages de couverture de ces deux documents en **Annexe 6**).

VIII – MICROTHEQUE DE PRODUCTION

- Il est conseillé de **placer les banques de souches en double dans deux bâtiments différents géographiquement séparés** en cas d'incendie, par exemple.
- Un certain nombre de souches, **trop anciennes**, doivent être renouvelées. Le LCV peut acquérir des souches de collection **auprès de l'Institut Pasteur de Paris**, par exemple, ou **isoler des souches de terrain**. **Collection de l'Institut Pasteur (CIP)** BP 52 – 25 rue du Dr. Roux – 75724 Paris cedex 15 – France – N° télécopie : 33 (0)1 40 61 30 07.
- Le consultant a transmis au LCV 2 souches de la collection Emvt (**pasteurella multocida 6 : E, 6 : B**) et a emporté en France, pour contrôle à l'Institut Pasteur de Paris 2 autres souches (Cl. Chauvoei, Cl. Septicum).
- A partir d'une nouvelle souche on constitue successivement un lot **G1 (1^{ère} génération) = lot de production** puis un lot **G2 (2^{ème} génération) = lot de semence**. On peut effectuer un passage sur animal (cobaye, lapin, bovin...) entre G1 et G2.
- Isolement de souches de terrain :
 - En général, en Afrique **il ne faut pas compter sur les services vétérinaires de terrain** pour faire parvenir au laboratoire des prélèvements de bonne qualité compatibles avec un isolement bactériologique. Ces services souffrent d'un manque chronique de moyens financiers.

- **Le laboratoire doit aller lui-même sur le terrain** pour faire ses propres prélèvements.
Il doit, pour ce faire, se « donner les moyens » : véhicule 4x4, équipe opérationnelle, budgets de fonctionnement, matériel de laboratoire de terrain.
- Le mieux : **isoler « au pied de l'animal »** sur un animal à l'agonie sacrifié ou sur un cadavre « frais ».
- **Disposer de matériel de laboratoire « de brousse » :**
 - 1 chalumeau avec cartouches de gaz.
 - Des milieux de culture de 1^{er} isolement :

Cultures anaerobiose	{	<ul style="list-style-type: none"> - Gélose au sang - BVF sous huile - Gélose VF profonde - Jarre anaerobie + gaspack ou bougie
Cultures en aerobiose	{	<ul style="list-style-type: none"> - Gélose sérum inclinée - Bouillon TS + sérum - Gélose au sang
 - Papiers buvards
- **De retour au laboratoire :**
 - Placer les milieux ensemencés à l'étuve.
 - Tentative de 1^{er} isolement direct ou subcultures sur milieux sélectifs.
 - En // : suite du protocole d'identification et **aliquots congelés** pour sécuriser la 1^{ère} culture en milieu liquide (ou directement du **liquide pleural si suspicion de PPCB**).
- Au LCV, enfin, il faut améliorer la « motivation » du secteur recherche-diagnostic pour effectuer l'isolement de souches de terrain.

IX – EQUIPEMENTS INDUSTRIELS ET DE LABORATOIRE : MAINTENANCE ET INVESTISSEMENTS

▪ Equipements industriels

- **Biofermenteur en continu :**
 - Démarrage en mars 1998. Marque Applikon (Bioteck GMBH)
 - **Effectuer des contrôles réguliers :**
 - Température
 - PH mètre
 - Filtres : point de bulle (10 stérilisations maximum)
 - Essais en pression
 - Intégrité des raccords souples
 - Avoir un **onduleur** plutôt qu'un stabilisateur pour protéger ce matériel.

- Un certain nombre d'équipements industriels doivent être renouvelés rapidement :
 - Une chaudière de proximité pour alimenter 2 à 4 autoclaves.
 - Un nouveau four électrique (pour 15 000 flacon peni 10 ml).
 - Une unité pour l'eau déminéralisée (500 à 1 000 litres par jour).
 - Une sertisseuse
 - Une machine à répartir les vaccins liquides (flacons plastiques 50-100 ml – 5 à 10 000/jour)
 - Un deuxième lyophilisateur (en sécurité) pour 8 000 flacons peni 10 ml.
 - 4 hottes à flux laminaires classe bactériologie.

▪ **Equipements de laboratoire**

La maintenance préventive et curative des équipements de laboratoire est un point à améliorer en priorité pour :

- Les hottes à flux laminaires :
 - Mesure du flux avec un amémomètre.
 - Surveillance du colmatage des filtres
 - Recherche des contaminants (boîte de petri, toutes les semaines, exposées sur le plan de travail).
- Les rampes à ultraviolets : mesure d'efficacité avec un radiomètre.
- PH mètres : calibration avec des solutions tampons. Entretien de l'électrode.
- Microscopes
 - Nettoyer les objectifs à immersion après chaque observation (toluène)
 - Acquérir un système contraste de phase.

Au cours de sa mission, le consultant a apporté tous les détails techniques nécessaires pour la maintenance de tous ces équipements de laboratoire de base.

- Il serait souhaitable, enfin, qu'un technicien soit affecté directement à la division production avec une formation en maintenance préventive et curative des équipements de laboratoire.

X – PROJET D'APPUI DE LA COOPERATION FRANCAISE AUPRES DU LCV

Au cours d'une réunion finale de restitution au Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France à Bamako, le 6 juillet 1999, le consultant a évoqué les actions prioritaires d'appui de la coopération française auprès du LCV qu'il serait souhaitable de mettre en place en 2000.

On peut citer :

- **Une formation à la maintenance du matériel de laboratoire**, en France, pour un technicien du LCV.
- **Deux missions d'appui auprès du LCV :**
 - Production de vaccin et contrôle de qualité (suite de la présente mission).
 - Formation à la maintenance préventive.
- **Un CSN :** formation ingénieur en appui au service de maintenance.

Ces orientations seront précisées et complétées **en septembre 1999**, avec l'appui du consultant, pour être présentées par le LCV au SCAC de Bamako.

XI – BIBLIOGRAPHIE

Au cours de sa mission le consultant a :

▪ Consulté des documents concernant le LCV :

- Appui logistique dans le cadre de la réalisation de l'étude de faisabilité de mise en œuvre d'un plan d'action du Laboratoire Central Vétérinaire – SERNES, Bamako (Mali) Dec.1997
- Rapport d'activités 1998 Laboratoire Central Vétérinaire, Janvier 1999
- Manual for bacterial antigen production – Goettingen IBT Bioreactor
- Volet LCV – Projet Sectoriel de l'Elevage GRM – US AID – 688 0218 – Dr. Alpha A. DIALLO, Dr. Boubacar Seck
- « Dossier technique complet pour l'enregistrement des produits du Laboratoire Central Vétérinaire du Mali » - Ministère du Développement rural et de l'Eau, 1998
- Mémoire de fin d'études : « Etude du pouvoir immunogène du Vaccin antipasteurellique bovin – pastobov – produit par le Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako. Amadou SERY (IPR/IFRA) Année 1998

▪ Transmis des publications à ses collègues :

- « Progress on the stability of vaccines – Session 1 : Current requirements and strategies for vaccine stabilisation : Experience with veterinary vaccines in warm climates ». J.J. Tulasne, P.C. Lefèvre, J. Blancou. « Who headquarters GENEVA, May 29-31, 1995
- Communication : « Le contrôle de qualité des vaccins et de la chaîne du froid lors des campagnes nationales de vaccination » : E. Couacy-Hymann, A. Kodjo, M. Ouattara, K. Kanga, S. Diawara, J. Domenech ; Revue Elevage, Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, 1992, 45 (2) 129-133.
- « Risk analysis in the manufacture of veterinary biologicals », Y. Moreau ; Revue scientifique et technique, Office International des Epizooties, 1995, 14 (4) 937-950.
- « La vie d'un vaccin » ; Dr. F.W. Milward : Congrès de la Société Française de Buiatrie, Paris, nov. 1995.-

▪ Conseillé un certain nombre d'ouvrages :

- « Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines » Office International des Epizooties, 1996
- « Vaccine manual : the production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries » FAO
- « L'évaluation des risques appliquée aux produits biologiques à usage vétérinaire » Revue scientifique et technique ; Office International des Epizooties, Vol.14, n°4, Décembre 1995
- « Risk assessment for veterinary biologicals » ; Summaries and conclusions - 1st International Symposium – Arlington, 5-7 decembre 1994

- « Production de vaccins contre la fièvre charbonneuse et le charbon symptomatique » Etude FAO Production et Santé animales n° 87
- « Contrôle de qualité du vaccin vivant atténué contre la péripneumonie contagieuse bovine : mode opératoire standard. Etude FAO Production et Santé animales n° 128
- « Quality control of veterinary vaccines in developing countries » FAO Animal production and Health paper n° 116
- « Bonnes pratiques de fabrication » : Ministère des Affaires Sociales de la Santé et de la Ville/Agence du Médicament
- « Infectious diseases of livestock (with special references to Southern Africa), Volume 1 - J.A.W..Coetzer, G.R.Thomson, R.C.Tustin, Oxford University Press, 1994
- « Infectious diseases of livestock (with special references to Southern Africa), Volume 2 - J.A.W..Coetzer, G.R.Thomson, R.C.Tustin, Oxford University Press, 1994

XII – CONCLUSION

- Grâce à un effort soutenu de **rénovation de ses équipements industriels et de laboratoire**, à la mise en place d'un **contrôle de qualité** rigoureux de ses produits, le L.C.V. connaît actuellement une **progression significative** de son volume de production et de son chiffre d'affaires.
- Il se situe **en bonne place dans un contexte régional concurrentiel**.
- Il devra, cependant, compléter rapidement **le rééquipement de ses laboratoires de production** en matériels industriels et être vigilant, car le facteur **limitant**, dans l'avenir, **sera plutôt l'efficacité de son service de maintenance** (préventive surtout) que la technologie de production elle-même.
- Il est vraiment regrettable que le L.C.V. soit freiné dans sa progression, actuellement, par les **graves problèmes d'approvisionnement** en électricité que connaît Bamako.
- Il est souhaitable, enfin, que le L.C.V. connaisse rapidement une **évolution institutionnelle** en séparant strictement son unité de production de vaccins (**EPIC**) du service public consacré au diagnostic et à la recherche (**EPST**) comme cela a été proposé lors d'une récente étude (SERNES 1997).

